

Title	シナプス構成分子によって媒介されるニューロンと微小電極との接合形成に関する研究と開発
Author(s)	金, 三英
Citation	
Issue Date	2023-06
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18707
Rights	
Description	Supervisor: 筒井 秀和, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	Kim Samyoung		
学位の種類	博士（マテリアルサイエンス）		
学位記番号	博材第 568 号		
学位授与年月日	令和 5 年 6 月 23 日		
論文題目	Research and development on the formation of neuron-microelectrode junction mediated by synapse organizing molecules		
論文審査委員	筒井秀和	北陸先端科学技術大学院大学	准教授
	水谷五郎	同	教授
	高村禅	同	教授
	平塚祐一	同	准教授
	阿部秀樹	名古屋大学	准教授

論文の内容の要旨

The nervous system of organisms is a complex system composed of various types of cells forming a neural network that uses electrical signals to control, process, and record the body's activity. Therefore, experiments and analyses on the dynamic flow of these electrical signals are necessary to understand the phenomena occurring in the human body. The study of bioelectricity and electrical properties of living organisms is known as electrophysiology, and the techniques used for such research are called electrophysiological techniques.

Electrophysiology technology using microelectrodes has a limitation in that it cannot selectively target specific types of cells within a variety of cells. These limitations make it difficult to study the functions and roles of specific cells. An optical electrophysiology technique using a fluorescence probe has recently emerged to solve this problem. However, this also has technical limitations. In particular, conventional electrophysiology techniques that can be used together with optical electrophysiology techniques are limited to intracellular recording using patch clamps or Insertion electrodes that damage cells. In addition, it is difficult to accurately measure action potentials solely with optical signals due to the low temporal resolution.

This study was conducted to overcome the limitations of conventional electrophysiology techniques using microelectrodes by using IL1RAPL1 (Interleukin-1 receptor accessory protein-like-1), a type of synapse organizer. Synapse organizers refer to adhesion molecules responsible for synapse formation and induction on the surface of the branch terminals of neurons.

This experiment consists of three chapters. The first chapter demonstrates the process of making the electrode smaller than the area of the axon terminal, as well as the presentation of the process of stably functionalizing the surface of the electrode. In the second chapter, neurons were cultured on the surface of electrodes that had been functionalized with IL1RAPL1, and then the inductive synaptic differentiation between the functionalized electrodes and neurons was confirmed. In the third chapter, based on the information obtained from the fabricated MEAs, simulation was used to test whether action

potentials could be measured from neurons. Since the electrodes were smaller than the axon terminal, it was expected that they would induce wrapping from the axon terminal, resulting in the formation of a high R_{seal} and the ability to measure the action potential of the axon terminal.

Unfortunately, recording action potentials from actual neurons was impossible in this study. However, the experiment demonstrated that the common limitations of conventional electrophysiology techniques using microelectrodes can be overcome. A new technique of introducing synapse organizers into electrodes was proposed and a stable method was established. These findings suggest that in future electrophysiological experiments using microelectrodes, long-term observation and analysis can be achieved through an extracellular recording by selectively targeting specific types of cells. The same lab is also experimenting with making synapse organizers respond to specific targets, which indicates that large-scale parallel measurement through more accurate targeting will be possible in the future.

Finally, this study showcases a novel approach to electrophysiology techniques employing microelectrodes. However, there are still many unfinished aspects left. Although these techniques have problems, ongoing improvement efforts can address these imperfections. I believe that this novel form of electrophysiology technology has the potential to make substantial contributions to future research in the field.

Keyword: Electrophysiology, Molecular biology, Biosensor, Neuron, Fluorescent protein

論文審査の結果の要旨

神経細胞（ニューロン）のネットワークにおける情報の符号化・保持・処理に関する基本原理は明らかではない。実験と理論の両輪の発展が重要であるが、実験研究における主要課題の一つとして、既存の細胞電気活動の実時間計測法が未成熟な点が挙げられる。細胞活動の計測は、微小電極を使う方法（電気的計測法）と光学プローブを使う方法（光学計測）とに大別できる。それぞれ特徴的な利点・欠点を持つ。既存の電気的計測法は、信号のS/N比や時間分解能などに優れる一方で細胞種に対する選択性を原理的に備えていないという欠点を持つ。光学計測においては、プローブ分子を細胞種特異的なプロモータの制御下に導入し、特定細胞からの信号を選択的に取得することができることと対照的である。ニューロンのネットワークは通常、多種の細胞で構成されており、それぞれの細胞は回路機能の実現に特定の役割を果たすと考えられているため、電気的計測法におけるこの欠点は極めて本質的である。

本論文は、生体内でニューロンが精緻に配線される際に重要な役割を果たしているシナプスオーガナイザーと呼ばれる分子群のシナプス誘導活性を利用することで、上記の電気的計測法における欠点を将来的に克服し得るかどうか、検討したものである。具体的には、interleukin-1 receptor family protein (IL1RAPL1)と呼ばれる天然のシナプスオーガナイザーを単離精製し、微細加工した微小金電極上に固定化し、そこにニューロンの初代培養を行う事により、オーガナイザーの生理活性を利用してニューロンと微小電極の接合構造を形成できることを見出した。プレシナプスマーカーのシナプトフィジンに対する抗体を用いた解析を行う事で、この接合がシナプスと構造的に類似していることを実証した。さらに、この接合を介した活動計測を行うための諸条件の検討を行った。具体的には、微小電極上に神経伝達物質であるグルタミン酸の電気化学センサーを構築し、2 μM というこの目的に十分な検出感度を達成できること、及び、容量性結合を介した直接計測を実現するための諸条件を等価回路シミュレーションを用いて考察している。

本論文の成果は、将来的に、生体内でニューロンが精緻に配線される分子機構を利用することで、細胞種選択性を備える微小電極技術の開発に向けた大きな足掛かりとなるものであり、学術的な貢献は大きい。よって、博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。